

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) 263993

(13) B1



(21) PV 1614-88.E
(22) Přihlášeno 11 03 88

(40) Zveřejněno 16 09 88
(45) Vydáno 15 07 89

(51) Int. Cl. 4
C 07 D 409.04

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

THE BRITISH LIBRARY

19 FEB 1990

SCIENCE REFERENCE AND
INFORMATION SERVICE

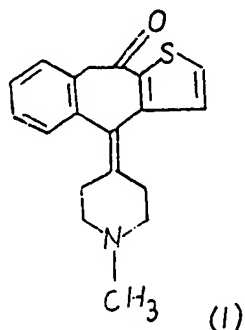
(75)
Autor vynálezu

POLÍVKA ZDENĚK Ing. CSc., PROTIVA MIROSLAV dr. Ing. DrSc.,
JELÍNEK IVAN RNDr., SNOPEK JIŘÍ RNDr., SMOLKOVÁ-KEULEMANSOVÁ
EVA prof. RNDr. DrSc., METYŠ JAN MUDr. CSc., VALCHÁŘ
MARTIN RNDr. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy čistých enantiomerů
4-[1-methyl-4-piperidylden]-4,9-dihydrobenzo[4,5]cyklohepta[1,2-b]-
thiofen-10-onu

(57) Řešení spadá do oboru syntetických léčiv. Jeho předmětem je způsob přípravy čistých enantiomerů 4-[1-methyl-4-piperidylden]-4,9-dihydrobenzo[4,5]cyklohepta[1,2-b]thiofen-10-onu (I), který je v racemické formě známý jako antihistaminově a antianafylakticky vysoce účinný ketotifen, používaný jako profylaktikum v terapii bronchiálního astmatu. Jeho štěpení na antipódy se provede podle řešení krystalizací diastereoisomerních směsí 1:1 solí s kyseliny (+)- nebo (-)-O,O'-dibenzoyl-D(nebo L)-vinnou nebo (+)- nebo (-)-O,O'-di-(p-toluyloxy)-D(nebo L)-vinnou do konstantní optické rotace, homogenní soli se potom rozloží vodným amoniakem a opticky čisté báze (+)- a (-)-ketotifenu se izolují extrakcí organickými rozpouštědly, odpařením extraktů a krystalizací z ethanolu, přičemž k ověření optické čistoty se použije isotachoforesy s beta-cykloextrinem jako aditivem vedoucího elektrolytu. Ve formě solí jsou oba enantiomery ketotifenu (I) vysoce účinnými H₁-antihistaminiky a (+)-isomer má značnou účinnost antianafylaktoidní a relativně značnou účinnost antimuskarinovou.

Vynález se týká způsobu přípravy čistých enantiomerů 4-(1-methyl-4-piperidyliden)-4,9-dihydrobenzo[4,5]cyklohepta[1,2-b]thiofen-10-onu vzorce I



(I)

Známými syntetickými postupy (Waldvogel E. et al.: *Helv. Chim. Acta* 59, 866, 1976; Německé (NSR) zveřejňovací spisy číslo 2 302 970, 2 144 490 a 2 111 071; US patenty č. 3 682 930, 3 960 894 a 4 128 549) se získává opticky inaktivní látka vzorce I, která ve formě soli s fumarovou kyselinou vykazovala vynikající antihistaminové, antialergické a antianafylaktické vlastnosti (Martin U. a Römer D.: *Arzneim.-Forsch.* 28, 770, 1978; *Triangel* 17, 141, 1978; *Pharmacol. Biochem. Prop. Drug Subst.* 3, 424, 1981) a našla rozsáhlé praktické použití jako profylaktikum záchvatů bronchiálního astmatu (Castañer J., Hillier K.: *Drugs Future* 2, 108, 1977; 3, 163, 1978; Alhadeff M.: *Med. Actual. (Drugs Today)* 14, 367, 1978; *Craps L.: Sandoz Revue* 1981 (2), 15). Látka vzorce I je známá pod mezinárodním generickým jménem „ketotifen“.

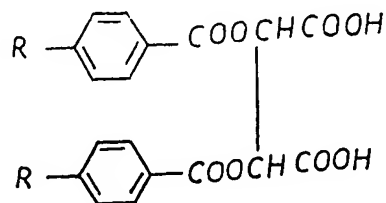
Molekula ketotifenu (I) neobsahuje centrum asymetrie a na první pohled tedy nepřipouští možnost chiralit a štěpení na optické antipody (enantiomery). Takovou možnost nenaznačila ani podrobná práce popisující fyzikálněchemickou a analytickou charakterizaci ketotifenu (I) (Mikotič-Mihun Z. et al.: *Acta Pharm. Jugosl.* 33, 129, 1983; *Yugosl. Chem. Papers* 8 (1), 23, 1984) ani studie metabolismu ketotifenu (I) (Le Bizot J. F. et al.: *Drug Metab. Dispos.* 11, 585, 1983).

Naproti tomu studie molekulárních modelů ketotifenu (I) ukázala, že neplanární prostřední kruh tricyklického systému dává možnost existence dvou mezních konformací, jejichž inverse je přítomností ketoskupiny značně ztížena a které by mohly představovat do značné míry stabilní enantiomery ketotifenu (I). Podobný jev byl pozorován v případě 3-substituovaných derivátů cyproheptadinu, u nichž byla prokázána existence stabilních chirálních konformerů (Ebnöther A. et al.: *Helv. Chim. Acta* 48, 1 237, 1965; Remy D. C. et al.: *J. Med. Chem.* 20, 1 013, 1977).

Správnost uvedené domněnky byla experimentálně potvrzena analyticky kapilární

isotachoforézou a mikropreparací. V literatuře existence chiralit molekuly ketotifenu (I) zatím uvedena nebyla a její objev je nutno považovat za překvapující. Způsob štěpení racemického ketotifenu (I) na antipody je předmětem předloženého vynálezu.

K štěpení racemické látky vzorce I lze použít krystalizaci směsí diastereoisomerů, které vznikají neutralizací látky vzorce I opticky aktivními kyselinami obecného vzorce II



(II)

ve kterém R je atom vodíku nebo methyl, přičemž v těchto solích s výhodou připadá na 1 molekulu báze vzorce I 1 molekula kyseliny obecného vzorce II. Jde tedy o opticky aktivní hydrogendibenzoyltartaráty nebo hydrogen-di(p-toluy)ltartaráty.

K štěpení se tedy použije buď komerčně přístupných kyselin (+)-O,O'-dibenzoyl-D-vinné a (-)-O,O'-dibenzoyl-L-vinné, nebo podle literatury (Stoll A., Hofmann A.: *Helv. Chim. Acta* 26, 922, 1943) připravených kyselin (+)-O,O'-di(p-toluy)l-D-vinné nebo (-)-O,O'-di(p-toluy)l-L-vinné.

Neutralizace racemické báze vzorce I opticky aktivními kyselinami obecného vzorce II se provede s výhodou v ethanolu a vyloučené diastereoisomerní směsi se krystalizují, s výhodou z vodného ethanolu. Teploty tání jednotlivých krystalizátů nejsou charakteristické, takže jich nelze použít jako kritéria dosaženého stupně štěpení. Krystalizace je nutné opakovat až do dosažení konstantní optické rotace soli. Kromě toho je nutné z každého krystalizátu uvolňovat opticky aktivní bázi a i u té kontrolovat optickou rotaci. Úplné rozštěpení je charakterizováno shodnou optickou rotací dvou za sebou následujících krystalizátů a z nich uvolněných bází.

Jako metoda pro hodnocení dosaženého stupně štěpení se osvědčila isotachoforéza používající β-cyklohextrinu jako aditiva vedoucího elektrolytu; touto metodou lze přímo stanovit v bázích procentové zastoupení obou enantiomerů.

Další podrobnosti způsobu přípravy čistých enantiomerů ketotifenu (I) vyplývají z příkladů, které jsou ovšem jen ilustrací možností vynálezu a není jejich úkolem vyčerpávajícím způsobem všechny možnosti popisovat. Enantiomerní báze vzorce I jsou krystalické látky, které krystalizují z etha-

nolu. Pravotočivá báze [(+)-I] má specifickou rotaci:

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = +114^{\circ} \text{ (ethanol, } c = 1);$$

levotočivá báze [(−)-I] má:

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = -114^{\circ} \text{ (ethanol, } c = 1).$$

Farmakologické hodnocení obou enantiomerů (hodnocených ve formě vodných roztoků hydrogenfumarátů) vykazalo určité difference, které naznačují stereoselektivitu účinků, i když ne příliš výraznou. Antihistaminový účinek (vůči histamin- H_1 receptorům) byl hodnocen inhibicí bronchospasmu u morčat, vyvolávaného histaminovým aerosolem. Střední ochranná dávka PD_{50} pro (+)-ketotifen je 0,028 mg/kg při orálním podání; pro (−)-ketotifen je $PD_{50} = 0,013$ miligramu/kg p. o.

Levotočivý enantiomer se tedy v tomto testu jeví být přibližně dvakrát účinnější, než pravotočivý enantiomer. Aktivita obou enantiomerů v tomto testu je enormně vysoká. Dále bylo srovnání provedeno hodnocením v testu anafylaktoidní kožní reakce u krysy, která byla vyvolávána podáním látky 48/80, tj. známého liberátoru histaminu. Antianafylaktoidní účinek (+)-ketotifenu je dán střední ochrannou dávkou $PD_{50} = 4,2$ mg/kg orálně.

Pro (−)-ketotifen se nepodařilo stanovit hodnotu PD_{50} : dávka 1 mg/kg p. o. omezuje rozvoj anafylaktoidní kožní reakce o 25 % (ve srovnání s kontrolou); zvyšování dávky až do 50 mg/kg p. o. nevede k statisticky významnému zvýšení antianafylaktoidního efektu. V případě tohoto testu se tedy pravotočivý enantiomer jeví být účinnou komponentou racemátu. I když je známo, že anticholinergní a antimuskarinový účinek ketotifenu (I) je relativně nízký, byly oba enantiomery srovnány z hlediska afinity k muskarinovým receptorům v krysím mozku v testu in vitro, přičemž byla určována inhibice vazby ligandu, tj. 0,5 nM (3H)chinnuklidinybenzilátu, k vazebným místům.

Výsledky jsou uvedeny jako střední inhibiční koncentrace IC_{50} . Pro (+)-ketotifen byla zjištěna hodnota $IC_{50} = 149$ nM; racemický ketotifen má $IC_{50} = 260$ nM; pro (−)-ketotifen byla zjištěna hodnota $IC_{50} = 1217$ nM. Také v tomto případě je tedy pravotočivý enantiomer účinnou komponentou racemátu. Opačný výsledek v případě testu histaminového aerosolu lze vysvětlit jednak skutečností, že H_1 antihistaminový účinek není stereoselektivní a dále tím, že účinnost obou enantiomerů je tak enormní, že 100% difference mezi oběma výsledky je v mezích experimentálních chyb.

Z hlediska racemizace jsou oba enantiomery ketotifenu (I) relativně stálé. K racemizaci dochází rychle při teplotě tání bázi (158 až 160 °C) a dále ve vroucím vodném

roztoku soli. Krystalizace bázi z vroucího ethanolu nevede k racemizaci. Vyplývá z toho, že energetická bariéra pro inverzi konformací obou enantiomerů je značně vysoká.

Příklad 1

K roztoku 7,8 g racemické báze ketotifenu [(±)-I] v 50 ml ethanolu se přidá 10,2 gramu kyseliny (−)-O,O'-di(p-toluy)-L-vinné a směs se zahřeje k varu. Vzniklý roztok kyselé soli se ponechá několik dní při 0 °C a potom se odsaje vyloučená sůl. Získá se ve výtěžku 16,8 g, takže jde o směs obou diastereoisomerů.

Její t. t. je 189 až 190 °C a

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = -74,65^{\circ} \text{ (70\% ethanol, } c = 0,2).$$

Vodným amoniakem uvolněná báze, izolovaná extrakcí benzenem a dokonalým odpařením rozpouštědla, má t. t. 159 až 162 °C a

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = +10,91^{\circ};$$

podle hodnocení isotachoforézou sestává z 54 % (+)-I a 46 % (−)-I. Jedinou krystalizací této směsi (5,0 g) z 350 ml 75% vodného ethanolu se získá 2,4 g naštápené soli s t. t. 184 až 187 °C a

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = -39,02.$$

Uvolněná báze má

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = +98,5^{\circ}$$

a podle kontroly isotachoforézou obsahuje 92 % (+)-I. Další krystalizace 2,15 gramu této soli z 200 ml 75% ethanolu poskytuje 1,5 g homogenního diastereoisomeru soli s t. t. 184 až 187 °C a

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = -33,05^{\circ}.$$

Uvolněná báze taje při 159 až 162 °C (ethanol) a má

$$[\alpha]_{20}^{\circ} = +114,14^{\circ}.$$

Podle kontroly isotachoforézou je to zcela homogenní pravotočivá báze ketotifenu [(+)-I].

Příklad 2

K roztoku 7,6 g racemické báze ketotifenu [(±)-I] v 15 ml ethanolu se přidá roztok 10,2 g kyseliny (−)-O,O'-dibenzoyl-L-vinné a roztok se ponechá krystalizaci po dobu 20 dnů. Potom se odsátím získá 16,8 g diastereoisomerní směsi tající při 154 až 155 °C. Trojnásobná krystalizace postupně ze 140, 120 a 100 ml 75% vodného ethanolu

vede k 8,5 g homogenního diastereoisomeru soli, t. t. 158 až 160 °C,

$$[\alpha]_{20}^D = -20,36^\circ.$$

Jako v předešlém příkladu uvolněná báze (3,8 g) taje při 159 až 162 °C (ethanol),

$$[\alpha]_{20}^D = +114,31^\circ.$$

Jde tedy opět o zcela homogenní pravotočivou bázi ketotifenu [(+)-I], která je identická s produktem příkladu 1. Systematické zpracování matečných luhů, získaných v příkladu 1 i 2 vede k dalšímu kvantitu báze (+)-I, což příznivě upraví výtěžnost.

Příklad 3

Neutralizace 12,9 g racemické báze keto-

tifenu [(±)-I] pomocí 18,1 g kyseliny (±)-O,O'-dibenzoyl-D-vinné se provede ve 100 mililitrech ethanolu a k získanému roztoku diastereoisomerní směsi solí se přidá za míchání 800 ml etheru. Po 24 hod. stání se směs solí odsaje; 27,0 g, t. t. 156 až 158 °C. Trojnásobná krystalizace z 85% ethanolu vede k 7,2 g homogenní soli, která taje při 158 až 160 °C a má

$$[\alpha]_{20}^D = +19,55^\circ \text{ (70\% ethanol, } c = 0,2\text{)}.$$

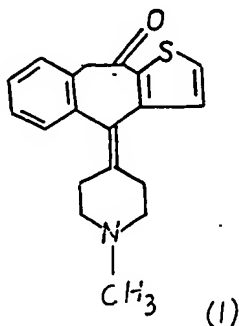
Uvolněná báze taje při 159 až 162 °C (ethanol) a má

$$[\alpha]_{20}^D = -113,91^\circ.$$

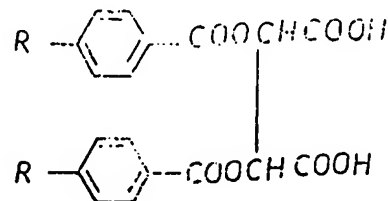
Podle kontroly isotachoforézou je to zcela homogenní levotočivá báze ketotifenu [(−)-I].

PŘEDMET VYNÁLEZU

Způsob přípravy čistých enantiomérů 4-(1-methyl-4-piperidyliden)-4,9-dihydrobenzo[4,5/cyklohepta/1,2-b/thiofen-10-onu vzorce I



vyznačují se tím, že se racemická báze vzorce I neutralizuje opticky aktivními kyselinami obecného vzorce II



(II)

ve kterém R je atom vodíku nebo methyl. vzniklé diastereoisomerní směsi kyselých solí se krystalizují z vodného ethanolu do konstantní optické rotace, rozloží se zředěným vodným amoniakem, uvolněné opticky aktivní báze (+)-I nebo (−)-I se izolují extrakcí těkavými a s vodou nemísitelnými rozpouštědly, získají se odpařením extraktů a krystalizací z ethanolu a jejich optická čistota se ověří isotachoforézou s β-cyklo-dextrinem jako aditivem vedoucího elektrolytu.

(19)
CZECHOSLOVAK
SOCIALIST
REPUBLIC

**SPECIFICATION OF INVENTION (11) 263,993
AUTHORS CERTIFICATE**

(13) B1

(21) PV 1614-88.E
(22) Filed 11 March 88

(51) Int. Cl. 4
C 07 D 409/04

(40) Laid open 18 Sept. 88
(45) Granted 15 July 89

**FEDERAL OFFICE
OF INVENTIONS**

(75)
Inventors:

POLIVKA ZDENEK Eng. CSc., PROTIVA MIROSLAV
Dr. Eng. DrSc., JELINEK IVAN RNDr., SNOPEK JIRI
RNDr., SMOLKOVA-KEULEMANSOVA EVA Prof.
RNDr. DrSc., METYS JAN MUDr. CSc., VALCHAR
MARTIN RNDr CSc., PRAGUE

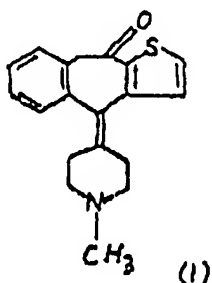
(54)

Method of preparation of pure enantiomers of 4-[1-methyl-4-piperidylidene]-4,8-dihydrobenzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]-thiophen-10-one

(57) The invention pertains to the field of synthetic resins. Its advantage is a method of preparation of pure enantiomers of 4-[1-methyl-4-piperidylidene]-4,8-dihydrobenzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]-thiophen-10-one (I), which in racemic form is known as the highly effective antihistaminic and antianaphylactic substance ketotifen, used as a preventive in treatment of bronchial asthma. Cleaving of this into enantiomers is performed according to the invention by crystallizing diastereoisomeric 1:1 mixtures of the salts with (+) or (-)-O,O'-dibenzoyl-D(or L)-tartaric or (+) or (-)-O,O'-di(p-toluy)-D(or L)-tartaric acid to a constant optical rotation, the homogeneous salts are then broken down by aqueous ammonia, and the optically pure bases (+) or (-) ketotifens are isolated by extraction with organic solvents, evaporation of the extracts and crystallization from ethanol, and to verify the optical purity

one uses isotachophoresis with beta-cyclodextrin as an additive to the conducting electrolyte. In salt form, both enantiomers of ketotifen (I) are highly effective H1-antihistamines and the (+) isomer has significant antianaphylactoid effectiveness and relatively significant antimuscarinic effectiveness.

The invention concerns a method of preparation of pure enantiomers of 4-[1-methyl-4-piperidylidene]-4,9-dihydrobenzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]-thiophen-10-one of formula I



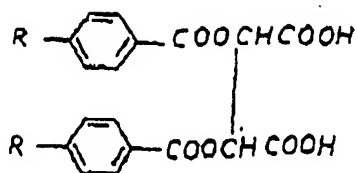
By using known synthetic techniques (Waldvogel E. et al.: *Helv. Chim. Acta* 59, 866, 1976; German (FRG) patent application number 2,302,870, 2,144,490 and 2,111,071; US patents 3,682,930, 3,960,894 and 4,128,549), one obtains optically inactive substances of formula I, which in the form of salt with fumaric acid has exhibited outstanding antihistaminic, antiallergic and antianaphylactic properties (Martin U. and Römer D.: *Arzneim.-Forsch.* 28, 770, 1978; *Triangel* 17, 141, 1978; *Pharmacol. Biochem. Prop. Drug Subst.* 3, 424, 1981) and has found broad practical use as a preventive of bronchial asthma attacks (Castaner J., Hillier K.: *Drugs Future* 2, 108, 1977; 3, 163, 1978; Alhadeff M.: *Med. Actual. (Drugs Today)* 14, 367, 1978; Craps L.: *Sandoz Revue* 1981 (2), 15). The substance of formula I is known by the international generic name "ketotifen".

The ketotifen (I) molecule does not possess a center of asymmetry and at first glance should not be amenable to the possibility of chirality or splitting into optical antipodes (enantiomers). Neither has such a prospect been pointed out by detailed papers describing the physical-chemical and analytical features of ketotifen (I) (Mikotic-Mihun Z. et al.: *Acta Pharm. Jugosl.* **33**, 129, 1983; *Yugosl. Chem. Papers* **8** (1), 23, 1984) or by studies of the metabolism of ketotifen (I) (Le Bigot J. F. et al.: *Drug Metab. Dispos.* **11**, 585, 1983).

On the contrary, study of molecular models of ketotifen (I) has shown that the nonplanar three-dimensional ring of a tricyclic system allows for the existence of two extreme conformations, the inverting of which is substantially impeded by the presence of the keto-group, and which might constitute significantly stable enantiomers of ketotifen (I). A similar phenomenon has been observed in the case of 3-substituted derivatives of cyproheptadine, in which the existence of stable chiral conformers has been demonstrated (Ebnöther A. et al.: *Helv. Chim. Acta* **48**, 1 237, 1965; Remy D. C. et al.: *J. Med. Chem.* **20**, 1 013, 1977).

The correctness of this surmise was experimentally confirmed by analytical capillary isotachophoresis and micropreparation. Thus far, the existence of chirality of the ketotifen (I) molecule has not been mentioned in the literature and its discovery must be considered surprising. A method of splitting the racemic ketotifen (I) into its antipodes is the subject of the present invention.

For splitting the racemic substance of formula I one can employ crystallization of a mixture of the diastereoisomers, arising by neutralization of the substance of formula I with optically active acids of general formula II



(II)

In which R is an atom of hydrogen or methyl, and in these salts it is advantageous for one molecule of the base of formula I to correspond to one molecule of acid of general formula II. Thus, these are optically active hydrogen dibenzoyl tartarates or hydrogen-di(p-toluy)l tartarates.

For the splitting, then, one uses either commercially available (+)-O,O'-dibenzoyl-D-tartaric or (-)-O,O'-dibenzoyl-L-tartaric acid, or according to the literature (Stoll A., Hofmann A.: *Helv. Chim. Acta* 26, 922, 1943) the (+)-O,O'-di(p-toluy)l-D-tartaric or (-)-O,O'-di(p-toluy)l-L-tartaric acid.

Neutralization of the racemic base of formula I by the optically active acids of general formula II is done advantageously in ethanol and the precipitated diastereoisomeric mixtures are crystallized, preferably from aqueous ethanol. The melting points of the individual crystallizates are not characteristic, so that they should not be used as a criterion for the degree of cleavage attained. The crystallization must be repeated until constant optical rotation of the salt is achieved. Furthermore, it is necessary to liberate the optically active bases from each crystallizate and/or check the optical rotation in it. Complete cleavage is characterized by consistent optical rotation for two consecutive crystallizates and the bases liberated from them.

One proven method of evaluating the achieved degree of cleavage is isotachophoresis using β -cyclodextrin as additive in the conducting electrolyte; this method can directly establish the percentage representation of both enantiomers in the bases.

Further details of the method of preparation of the pure enantiomers of ketotifen (I) will emerge from the examples, which are merely an illustration of the possibilities of the invention and it is not their task to exhaustively describe every possibility. The enantiomeric bases of formula I are crystalline substances, which crystallize from ethanol. The dextrorotatory base [(+)-I] has the specific rotation:

$$[\alpha]_{20}^D = +114^\circ \text{ (ethanol, } c = 1\text{);}$$

the levorotatory base [(-)-I] has:

$$[\alpha]_{20}^D = -114^\circ \text{ (ethanol, } c = 1\text{).}$$

Pharmacological evaluation of both enantiomers (evaluated in the form of aqueous solutions of hydrogen fumarates) revealed a definite difference, indicative of the stereoselectivity of the effects, albeit not overly pronounced. The antihistamine effect (on histamine-H1 receptors) was evaluated by inhibition of bronchospasm in guinea pigs, elicited by histamine aerosol. The mean preventive dose PD50 for (+)-ketotifen is 0.028 mg/kg under oral administration; for (-)-ketotifen, PD50 is 0.013 mg/kg p.o.

The levorotatory enantiomer in this test thus proves to be approximately twice as effective as the dextrorotatory enantiomer. The activity of both enantiomers in this test is enormously high. A further comparison was done by evaluating the anaphylactoid skin reaction in rats, elicited by administering the substance 48/80, i.e., a known liberator of histamine. The antianaphylactoid effect of (+)-ketotifen is given by the mean preventive dose of $PD_{50} = 4.2$ mg/kg oral.

It was not possible to establish the PD_{50} value for (-)-ketotifen; a dose of 1 mg/kg p.o. restricts the development of the anaphylactoid skin reaction by 25% (compared to the control); increasing the dose up to 50 mg/kg p.o. does not produce a statistically significant increase in the antianaphylactoid effect. In this test, therefore, the dextrorotatory enantiomer appears to be the effective component of the racemate. And although it is known that the anticholinergic and antimuscarinic effect of ketotifen (I) is relatively slight, both enantiomers were compared in regard to affinity to the muscarinic receptors in the rat brain in an in vitro test, during which the inhibition of the ligand bond was determined, i.e., 0.5 nM (3H)quinucildinyl benzylate, to the bonding sites.

The findings are given as the mean inhibitory concentration IC_{50} . For (+)-ketotifen we found a value of $IC_{50} = 149$ nM; racemic ketotifen has $IC_{50} = 280$ nM; for (-)-ketotifen we found a value $IC_{50} = 1217$ nM. Thus, in this case, it is the dextrorotatory enantiomer which is the effective component of the racemate. The contrary finding in the case of the histamine aerosol test can only be explained by the fact that the H1 antihistamine effect is not stereoselective, and also in that

the effectiveness of both enantiomers is so enormous that a 100% difference between both findings is within the range of experimental error.

From the standpoint of racemization, both enantiomers of ketotifen (I) are relatively stable. Racemization quickly proceeds at the melting point of the bases (158 to 160°C) and also in boiling aqueous solution of the salts. Crystallization of the bases from boiling ethanol does not result in racemization. This indicates that the energy barrier for inversion of the conformation of both enantiomers is significantly high.

Example 1

To a solution of 7.8 g of the racemic base ketotifen [(±)-I] in 50 ml of ethanol is added a solution of 10.2 grams of (-)-O,O'-di(p-toluyI)-L-tartaric acid and the mixture is heated to boiling. The resulting solution of the acid salt is let stand several days at 0°C, after which the precipitated salt is drawn off. The yield is 16.8 g, so that this is a mixture of both diastereoisomers.

The melting point is 189 to 190°C and
 $[\alpha]_{20}^D = -74.65^\circ$ (70% ethanol, $c = 0.2$).

The base is liberated with aqueous ammonia, isolated by benzene extraction and complete evaporation of the solvent; the melting point is 159 to 162°C and
 $[\alpha]_{20}^D = +10.91^\circ$;

according to isotachophoresis evaluation, it consists of 54% (+)-I and 46% (-)-I.

By mere crystallization of this mixture (5.0 g) from 350 ml of 75% aqueous ethanol, one obtains 2.4 g of the cloven salt with melting point 184 to 187°C and $[\alpha]_{20}^D = -39.02$.

The liberated base has

$[\alpha]_{20}^D = +98.5^\circ$

and per isotachophoresis contains 92% of (+)-I. Further crystallization of 2.15 grams of this salt from 200 ml of 75% ethanol yields 1.5 g of homogeneous diastereoisomer of the salt with melting point of 184 to 187°C and $[\alpha]_{20}^D = -33.05^\circ$.

The liberated base melts at 159 to 162°C (ethanol) and has

$[\alpha]_{20}^D = +114.14^\circ$.

According to isotachophoresis, it is entirely the homogeneous dextrorotatory base of ketotifen [(+)-I].

Example 2

To a solution of 7.8 g of the racemic base ketotifen [(±)-I] in 15 ml of ethanol is added a solution of 10.2 g of (-)-O,O'-dibenzoyl-L-tartaric acid and the solution is left to crystallize for 20 days. After this, 16.8 g of a diastereoisomer mixture is drawn off, melting point 154 to 155°C. Triple crystallization consecutively from 140, 120 and 100 ml of a 75% aqueous ethanol yields 8.5 g of homogeneous diastereoisomer of the salt, melting point 158 to 160°C.

$$[\alpha]_{20}^D = -20.36^\circ.$$

As in the preceding case, the liberated base (3.8 g) melts at 159 to 162°C (ethanol),

$$[\alpha]_{20}^D = +114.31^\circ.$$

Thus, once again, this is the entirely homogeneous dextrorotatory base of ketotifen [(+)-I], which is identical to the product of example 1. Systematic processing of the mother liquors obtained from example 1 and 2 results in a further quantum of base (+)-I, which favorably adjusts the yield.

Example 3

Neutralization of 12.9 g of racemic base ketotifen [(±)-I] by means of 18.1 g of (+)-O,O'-dibenzoyl-D-tartaric acid is carried out in 100 milliliters of ethanol and to the resulting solution of diastereoisomer mixture of the salt is added 800 ml of ether while stirring. After 24 hours standing, the mixture of salts is drawn off; 27.0 g, melting point 158 to 158°C. Triple crystallization from 85% ethanol results in 7.2 g of homogeneous salt, which melts at 158 to 160°C and has $[\alpha]_{20}^D = +19.55^\circ$ (70% ethanol, c = 0.2).

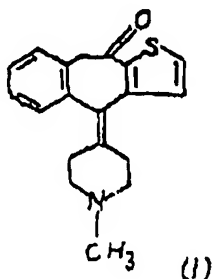
The liberated base melts at 159 to 162°C (ethanol) and has $[\alpha]_{20}^D = -113.91^\circ$.

According to isotachophoresis, this is the entirely homogeneous levorotatory base of ketotifen [(-)-I].

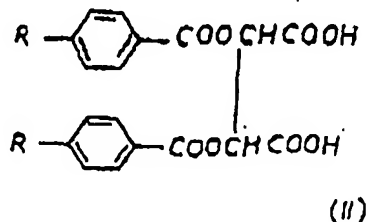
11

CLAIMS

Method of preparation of pure enantiomers of 4-[1-methyl-4-piperidylidene]-4,9-dihydrobenzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10-one of formula I



characterized in that the racemic base of formula I is neutralized with optically active acids of general formula II



In which R is an atom of hydrogen or methyl, the resulting diastereoisomer mixtures of acid salts are crystallized from aqueous ethanol until constant optical rotation is achieved, then broken down with dilute aqueous ammonia, the liberated optically active bases (+)-I or (-)-I are isolated by extraction with volatile and water-immiscible solvents and recovered by evaporation of the extracts and

02/27/2001 13:37 5088982020
02/26/2001 12:48 7813344445

NLDLAW
INTRANSCO

PAGE 13/13
PAGE 13

12

crystallization from ethanol, and their optical purity is verified by isotachophoresis
in β -cyclodextrin as additive to the conducting electrolyte.